



n-ヘキサデカンの
細菌を用いる
復帰変異試験

厚生省生活衛生局 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所

【目 次】

	頁
要 約	1
緒 言	2
材料および試験方法	3
試験結果および考察	7
参 考 文 献	9
表 1～3	

【要 約】

n-ヘキサデカンの変異原性の有無について、細菌を用いる復帰変異試験を実施することにより検討した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、直接試験および代謝活性化試験のいずれも、用量設定試験は 50~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で、本試験は 312.5~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で試験を行った。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌について、いずれの用量でも復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことから、n-ヘキサデカンは、用いた試験系において変異原性を有しない（陰性）と判定された。

【結 言】

OECD既存化学物質安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として、日本が独自に選定した既存化学物質の1つである、n-ヘキサデカンについて、細菌を用いる復帰変異試験をプレート法により実施した。

この試験は、サルモネラ（ネズミチフス菌）におけるヒスチジン要求性から非要求性への復帰変異⁽¹⁾、ならびに大腸菌におけるトリプトファン要求性から非要求性への復帰変異⁽²⁾を指標とした変異原の検出系である。

試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる直接試験と、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素（S9 混液）によって産生される被験物質の代謝物の変異原性を試験する代謝活性化試験とからなっている。

本試験は、「新規化学物質に係る試験の方法について」（昭和62年3月31日、環保業第237号、薬発第306号、62基局第303号）およびOECD化学品試験法ガイドライン：471, 472 に準拠し、化学物質GLP（昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、改訂昭和63年11月18日、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号）に基づいて実施した。

【材料および試験方法】

〔検定菌〕

Salmonella typhimurium TA100
Salmonella typhimurium TA1535
Escherichia coli WP2 *uvrA*
Salmonella typhimurium TA98
Salmonella typhimurium TA1537

S. typhimurium の4菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、
から分与を受けた。

E. coli WP2 *uvrA* 株は1979年5月9日に から
分与を受けた。

検定菌は、 -80°C 以下で凍結保存した。

試験に際して、0.5%塩化ナトリウム添加ニュートリエントブロス (Difco) を入
れたL字型試験管に種菌を接種し、 37°C 、10時間往復振とう培養したものを検定菌
液とした。

〔被験物質〕

n-ヘキサデカン (CAS No. 544-76-3、以下n-HDと略) は、分子量 226.45、
比重 0.77、沸点 287°C 、無色透明の液体である。純度 99.8%のもの (ロット番号：
) を から供与された。被験
物質は、使用時まで室温で遮光して保存した。

n-HDは、アセトン (ロット番号：ECP 7706、和光純薬) を用いて 50 mg/ml
になるように調製した後、同溶媒で更に公比2ないし3で希釈したものを、速やか
に試験に用いた。

試験の開始に先立って、秦野研究所においてn-HDのアセトン溶液中での安定
性試験を行った。安定性試験における溶媒が当研究所で実施される、培養細胞を用
いる染色体異常試験と共通なことから、両試験における最高濃度 (200 mg/ml) お

よび最低濃度 (3.15 mg/ml) の 2 濃度について室温、遮光条件下で実施した。その結果、調製後 3 時間における各 3 サンプルの平均含量は、それぞれ初期値の平均 (0 時間) に対して、105 および 98.2%であった。これらの値は、当研究所の標準操作手順書の基準 (初回の測定平均値の 90%以上) を満たしていた (Appendix 1)。

また、本試験に用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、50 mg/ml 溶液については、91.1~93.9%、3.125 mg/ml 溶液については、104~107%の回収率が得られた。これらの値も、当研究所の標準操作手順書の基準 (平均含量は添加量の 85%以上) を満たしていた (Appendix 2)。

以上の結果から、n-HDはアセトン溶液中では安定であり、また調製液中の被験物質の含量は所定の値の範囲内にあることが確認された。

[陽性対照物質]

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

AF-2 : フリルフラマイド	(上野製薬 ^株)	ロット番号 46,	純度99.9%)
SA : アジ化ナトリウム	(和光純薬工業 ^株)	ロット番号 TLN5556,	純度>90%)
9-AA : 9-アミノアクリジン	(東京化成工業 ^株)	ロット番号 AM 01,	純度>98%)
2-AA : 2-アミノアントラセン	(和光純薬工業 ^株)	ロット番号 EDE7881,	純度>90%)

AF-2, 9-AA, 2-AA は DMSO (和光純薬工業^株 ロット DSL5887 および ECJ7001) に、SA は蒸留水に溶解して試験に用いた。

[培地および S9 混液の組成]

1) トップアガー (TA菌株用)

下記の水溶液 (A) および (B) を容量比 10:1 の割合で混合した。

(A) バクト・アガー (Difco)	0.6%	(B) L-ヒスチジン	0.5 mM
塩化ナトリウム	0.5%	ビオチン	0.5 mM

* : WP2 用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

2) 合成培地

培地は、日清製粉株式会社製の最少寒天培地（用量設定試験ではロット番号：DJ050GG、1991年7月9日製造、本試験ではロット番号：DJ060IG、1991年9月3日製造）を用いた。なお、培地1ℓあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2 g	リン酸水素アンモニウムナトリウム・4水和物	3.5 g
クエン酸・1水和物	2 g	グルコース	20 g
リン酸水素二カルシウム	10 g	バクト・アガー (Difco)	15 g

径 90 mm のシャーレ1枚あたり 30 ml を流して固めてある。

3) S9 混液（1 ml 中下記の成分を含む）

^{***} S9	0.1 ml	NADH	4 μmole
塩化マグネシウム	8 μmole	NADPH	4 μmole
塩化カルシウム	33 μmole	0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.4)	0.5 ml
グルコース・6リン酸	5 μmole		

** : 7週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットをフェノバルビタール(PB)および5、6-ベンゾフラボン(BF)の併用投与で酵素誘導して作製した S9 (キッコーマン種、用量設定試験ではロット番号 RAA-254、1991年5月23日製造、本試験ではロット番号 RAA-258、1991年8月23日製造)を用いた。PBおよびBFの投与量は1日目 PB 30 mg/kg、2日目 PB 60mg/kg、3日目 PB 60 mg/kg および BF 80 mg/kg、4日目 PB 60 mg/kg であり、いずれも腹腔内投与したものである。

(試験方法)

プレート法により直接試験および代謝活性化試験を行った。

小試験管中にトッパアガー 2 ml、被験物質調製液 0.1 ml、リン酸緩衝液 0.5 ml (代謝活性化試験においては S9 混液 0.5 ml)、検定菌液 0.1 ml を混合したのち

合成培地平板上に流して固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりにアセトン、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は表中に示した。培養は37℃で48時間行い、生じた復帰変異コロニー数を算定した。用いた平板は用量設定試験においては、陰性および陽性対照群では3枚ずつ、各用量については1枚ずつとした。また、本試験においては両対照群および各用量につき、3枚ずつを用い、それぞれその平均値と標準偏差を求めた。用量設定試験は1回、本試験は同一用量について2回実施し、再現性の確認を行った。

〔判定基準〕

被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数が、陰性対照のそれに比べて2倍以上に増加し、かつ、その増加に再現性あるいは用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有する（陽性）と判定することとした。

【試験結果および考察】

試験の全過程を通して、信頼性に悪影響を及ぼすおそれのある予期し得なかった事態および試験計画書からの逸脱はなかった。

〔用量設定試験〕

結果を表1に示した。50～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で試験を実施したところ、すべての検定菌の直接試験および代謝活性化試験において抗菌性は認められなかった。

なお、直接試験、代謝活性化試験のいずれにおいても、1500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で寒天表面に被験物質由来の沈澱が認められた。

したがって、本試験における最高用量を、すべての菌種で、直接試験および代謝活性化試験ともに 5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とし、公比2で5用量を設定することとした。

〔本試験〕

結果を表2、3に示した。n-HDについて、312.5～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で試験を実施した。2回の試験を通して、用いた5種類の検定菌の直接試験、代謝活性化試験のいずれにおいても、用量依存性のある変異コロニー数の増加は認められなかった。また、すべての菌種において抗菌性は認められなかった。なお、直接試験、代謝活性化試験のいずれにおいても、2500 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上の用量で、寒天表面に被験物質由来の沈澱が認められた。

n-HDについて実施した試験において、陽性対照群では、いずれの検定菌においても変異コロニー数の増加が認められ、陰性対照群とも、計測された変異コロニー数はヒストリカルコントロール値の範囲内であったことから、本試験に用いた各検定菌の感受性および各陽性対照物質の変異原活性についての安定性が確認された。

以上の結果に基づき、 α -HDは、用いた試験系において変異原性を有しないもの（陰性）と判定した。

【参 考 文 献】

- (1) Maron, D. M. and Ames, B. N.: Mutation Research. 113: 173-215 (1983)
- (2) Green, M. H.: in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." Kilby, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C. (eds.) Elsevier Science Publisher, New York. (1984) pp.161-187.

用量設定試験結果表

試験物質: n-ヘキサデカン

M-91-178

物質	検体濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	SSMixの有無	復 帰 変 異					コロニー数/プレート										
			塩 基 対 置 換 型			フ レ ー ム シ フ ト 型												
			TA100		TA1535		MP2uvrA		TA98			TA1537						
溶媒対照		-	162 (147 ± 15)	146 (145 ± 14.5)	133	9 (13 ± 4)	16 (14 ± 3.6)	14	16 (15 ± 3.2)	17	11 (11 ± 3.2)	20 (19 ± 1.5)	19	17 (15 ± 1.5)	16 (11 ± 4.6)	10 (7 ± 4.6)	7	
検 体	50	-	121			14			10			28			14			
	150	-	129			8			25			27			8			
	500	-	124			18			26			18			9			
	1500	-	104			16			17			15			6			
	5000	-	133			9			11			15			7			
溶媒対照		+	94 (110 ± 16)	99 (24.1)	138	9 (10 ± 1)	10 (0.6)	10	13 (16 ± 7.4)	24	27 (32 ± 4.4)	35	34 (4.4)	8 (13 ± 5.5)	19	13 (5.5)		
検 体	50	+	119			12			16			39			13			
	150	+	138			12			12			40			9			
	500	+	126			16			16			40			11			
	1500	+	135			15			10			22			9			
	5000	+	160			8			15			24			10			
陽性対照	SSMixを必要としないもの	名 称	AF2 0.01		SA 0.5		AF2 0.01		AF2 0.1		9AA 80							
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	AF2 0.01		SA 0.5		AF2 0.01		AF2 0.1		9AA 80							
		コロニー数 / プレート	673 (655 ± 18)	686 (43.5)	605	188 (219 ± 31)	245 (28.7)	223	160 (169 ± 9.5)	179 (9.5)	168	745 (762 ± 17)	784 (20.0)	757	2796 (2869 ± 173)	2908 (63.3)	2903	
		名 称	2AA 1		2AA 2		2AA 10		2AA 0.5		2AA 2							
	濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	2AA 1		2AA 2		2AA 10		2AA 0.5		2AA 2								
	コロニー数 / プレート	808 (802 ± 6)	787 (13.4)	812	173 (160 ± 13)	151 (11.4)	157	626 (629 ± 3)	633 (3.5)	629	146 (169 ± 23)	189 (21.7)	173	177 (174 ± 3)	184 (11.8)	161		

復帰変異試験結果表 I

M-91-178

表 2
被験物質: n-ヘキサデカン

物質	検体濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	SSMixの有無	復帰変異														
			塩基対置換型						フレームシフト型								
			TA100			TA1535			WP2uvrA			TAS8			TA1537		
溶媒対照		-	119	98	134	12	19	13	25	32	33	26	36	31	10	9	9
			(117 ± 18.1)		(15 ± 3.8)		(30 ± 4.4)		(31 ± 5.0)		(9 ± 0.6)						
検体	312.5	-	122	101	134	12	13	10	26	33	31	21	20	22	8	9	8
			(119 ± 16.7)		(12 ± 1.5)		(30 ± 3.6)		(21 ± 1.0)		(8 ± 0.6)						
	625	-	144	116	123	19	18	11	28	28	28	33	31	24	11	10	8
			(128 ± 14.6)		(16 ± 4.4)		(28 ± 0.0)		(29 ± 4.7)		(10 ± 1.5)						
	1250	-	155	122	140	11	8	13	28	29	27	37	39	37	7	7	10
		(139 ± 16.5)		(11 ± 2.5)		(28 ± 1.0)		(38 ± 1.2)		(8 ± 1.7)							
2500	-	126	159	131	10	10	13	28	42	33	22	18	19	9	8	10	
		(139 ± 17.8)		(11 ± 1.7)		(34 ± 7.1)		(20 ± 2.1)		(9 ± 1.0)							
5000	-	153	136	129	14	13	14	32	16	18	15	24	21	7	9	7	
		(139 ± 12.3)		(14 ± 0.6)		(22 ± 8.7)		(20 ± 4.6)		(8 ± 1.2)							
溶媒対照		+	131	139	137	25	15	16	30	25	33	47	44	34	14	13	9
			(136 ± 4.2)		(19 ± 5.5)		(29 ± 4.0)		(42 ± 6.8)		(12 ± 2.6)						
検体	312.5	+	123	136	116	19	14	18	30	28	30	27	32	34	10	7	10
			(125 ± 10.1)		(17 ± 2.6)		(29 ± 1.2)		(31 ± 3.6)		(9 ± 1.7)						
	625	+	134	122	102	21	23	23	28	28	29	44	31	40	9	11	3
			(119 ± 16.2)		(22 ± 1.2)		(28 ± 0.6)		(38 ± 6.7)		(8 ± 4.2)						
	1250	+	128	102	130	16	19	12	34	27	32	34	32	39	11	16	12
		(120 ± 15.6)		(16 ± 3.5)		(31 ± 3.6)		(35 ± 3.6)		(13 ± 2.6)							
2500	+	155	119	139	17	20	13	34	40	32	33	35	38	3	10	12	
		(138 ± 18.0)		(17 ± 3.5)		(35 ± 4.2)		(35 ± 2.5)		(8 ± 4.7)							
5000	+	147	122	118	18	19	16	27	20	25	46	48	33	18	23	10	
		(129 ± 15.7)		(18 ± 1.5)		(24 ± 3.6)		(42 ± 8.1)		(17 ± 6.6)							
陽性対照	SSMixを必要としないもの	名称	AF2 0.01			SA 0.5			AF2 0.01			AF2 0.1			9AA 80		
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	AF2 0.01			SA 0.5			AF2 0.01			AF2 0.1			9AA 80		
		コロニー数/プレート	649	607	626	278	270	272	134	122	100	662	629	654	2907	2737	2637
			(627 ± 21.0)		(273 ± 4.2)		(119 ± 17.2)		(648 ± 17.2)		(2760 ± 136.5)						
陽性対照	SSMixを必要とするもの	名称	2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5			2AA 2		
		濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5			2AA 2		
		コロニー数/プレート	721	762	774	180	180	186	537	522	593	205	206	206	175	205	204
			(752 ± 27.8)		(182 ± 3.5)		(551 ± 37.4)		(206 ± 0.6)		(195 ± 17.0)						

復帰変異試験結果表Ⅱ

M-91-178

試験物質：n-ヘキサデカン

物質	検体濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	SSMixの有無	復帰変異					コロニー数/プレート															
			塩基対置換型			フレームシフト型			TA100			TA1535			WP2vrA			TA98			TA1537		
			TA100	TA1535	WP2vrA	TA98	TA1537	TA100	TA1535	WP2vrA	TA98	TA1537	TA100	TA1535	WP2vrA	TA98	TA1537	TA100	TA1535	WP2vrA	TA98	TA1537	
溶媒対照		-	146 (161 ±)	161 (175 ±)	175 (14.5)	19 (20 ±)	17 (3.6)	24 (3.0)	12 (12 ±)	12 (0.0)	12 (0.0)	21 (26 ±)	33 (6.1)	25 (6.1)	11 (9 ±)	10 (2.1)	7 (2.1)						
検体	312.5	-	163 (139 ±)	137 (22.6)	118 (22.6)	8 (11 ±)	14 (3.0)	11 (3.0)	18 (16 ±)	14 (2.0)	16 (2.0)	31 (28 ±)	27 (2.6)	26 (2.6)	7 (6 ±)	6 (1.5)	4 (1.5)						
	625	-	141 (127 ±)	116 (12.9)	123 (12.9)	10 (13 ±)	10 (4.6)	18 (4.6)	24 (16 ±)	12 (6.9)	12 (6.9)	18 (19 ±)	20 (1.2)	20 (1.2)	3 (4 ±)	4 (0.6)	4 (0.6)						
	1250	-	140 (139 ±)	132 (6.1)	144 (6.1)	13 (11 ±)	7 (3.5)	13 (3.5)	11 (9 ±)	8 (1.7)	8 (1.7)	22 (21 ±)	20 (1.2)	20 (1.2)	4 (7 ±)	6 (3.6)	11 (3.6)						
	2500	-	121 (143 ±)	174 (27.6)	134 (27.6)	17 (14 ±)	7 (5.8)	17 (5.8)	8 (15 ±)	18 (6.1)	19 (6.1)	22 (19 ±)	17 (2.5)	19 (2.5)	5 (8 ±)	10 (2.5)	8 (2.5)						
	5000	-	118 (131 ±)	144 (13.0)	130 (13.0)	11 (11 ±)	10 (1.0)	12 (1.0)	8 (11 ±)	9 (4.4)	16 (4.4)	10 (13 ±)	15 (2.5)	13 (2.5)	7 (6 ±)	6 (0.6)	6 (0.6)						
溶媒対照		+	172 (145 ±)	136 (24.2)	126 (24.2)	14 (17 ±)	16 (3.1)	20 (3.1)	17 (16 ±)	14 (1.7)	17 (1.7)	48 (45 ±)	43 (2.5)	45 (2.5)	9 (8 ±)	5 (2.3)	9 (2.3)						
検体	312.5	+	163 (142 ±)	135 (18.9)	127 (18.9)	14 (14 ±)	18 (4.0)	10 (4.0)	21 (19 ±)	16 (2.5)	19 (2.5)	33 (25 ±)	18 (7.5)	25 (7.5)	12 (9 ±)	8 (2.6)	7 (2.6)						
	625	+	141 (150 ±)	141 (16.2)	169 (16.2)	13 (11 ±)	13 (2.9)	8 (2.9)	11 (14 ±)	14 (3.0)	17 (3.0)	25 (24 ±)	18 (5.6)	29 (5.6)	10 (7 ±)	6 (2.3)	6 (2.3)						
	1250	+	151 (144 ±)	153 (13.9)	128 (13.9)	12 (8 ±)	7 (3.6)	5 (3.6)	14 (13 ±)	10 (2.3)	14 (2.3)	26 (28 ±)	23 (5.7)	34 (5.7)	6 (9 ±)	11 (2.5)	9 (2.5)						
	2500	+	161 (137 ±)	118 (21.9)	132 (21.9)	10 (10 ±)	9 (1.5)	12 (1.5)	17 (17 ±)	13 (3.5)	20 (3.5)	30 (25 ±)	23 (4.4)	22 (4.4)	6 (6 ±)	8 (1.5)	5 (1.5)						
	5000	+	141 (148 ±)	151 (6.4)	153 (6.4)	8 (9 ±)	10 (1.2)	10 (1.2)	19 (19 ±)	21 (2.5)	16 (2.5)	24 (19 ±)	16 (4.4)	17 (4.4)	4 (5 ±)	5 (1.5)	7 (1.5)						
対照	SSMixを必要としないもの	名称	AF2 0.01			SA 0.5			AF2 0.01			AF2 0.1			9AA 80								
		コロニー数/プレート	745 (734 ±)	714 (17.1)	742 (17.1)	244 (250 ±)	256 (6.0)	251 (6.0)	182 (182 ±)	184 (1.5)	181 (1.5)	754 (819 ±)	833 (58.8)	869 (58.8)	2963 (2817 ±)	2812 (143.6)	2676 (143.6)						
	SSMixを必要とするもの	名称	2AA 1			2AA 2			2AA 10			2AA 0.5			2AA 2								
		コロニー数/プレート	649 (760 ±)	842 (99.9)	790 (99.9)	208 (186 ±)	199 (30.6)	151 (30.6)	550 (587 ±)	565 (51.1)	645 (51.1)	322 (327 ±)	348 (18.6)	312 (18.6)	256 (241 ±)	254 (24.8)	212 (24.8)						